

## 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 柏木 静

横浜市立大学大学院医学研究科 生体制御・麻酔科学

### 審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 益 田 宗 孝

副査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 五 嶋 良 郎

副査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 田 中 章 景

## 博士の学位論文審査結果の要旨

### Prevention of Burn-induced Inflammatory Responses and Muscle Wasting by GTS-21, a Specific Agonist for $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptors

$\alpha 7$  アセチルコリン受容体刺激薬 GTS-21 は熱傷後の炎症反応と筋萎縮を防止する

本研究では $\alpha 7$  アセチルコリン受容体( $\alpha 7$  AChRs)刺激により、体幹部 III 度熱傷後のマウスにおいて炎症反応およびタンパク分解シグナルが抑制され、熱傷遠隔部の骨格筋の萎縮に改善が得られることを示したものである。 $\alpha 7$  AChRs アゴニストである GTS-21 の投与により、熱傷後の骨格筋および血清の炎症性サイトカイン、サイトカイン下流の炎症メディエーターである STAT3 および NF- $\kappa$ B の活性化が抑制された。また、筋萎縮遺伝子 MuRF1 の増加が抑制され、筋重量の減少が抑制された。これらの効果は、 $\alpha 7$  AChRs アンタゴニストの併用もしくは $\alpha 7$  AChR ノックアウトマウスでは認められず GTS-21 が $\alpha 7$  AChRs を介して抗炎症・抗筋萎縮効果を呈することが示された。以上の結果より、 $\alpha 7$  AChRs 刺激が熱傷後の炎症反応および骨格筋萎縮を改善するための有用な選択肢となりうると報告している。

審査にあたり上記内容について研究報告の説明がなされた後、以下の質疑応答がなされた。

#### 田中章景副査からの質問

- 1) 本研究では熱傷 3 日後の筋重量の変化を提示していたが、それ以降の変化は調べられたのか。
- 2) MuRF1 と Atrogin-1 の結果の違いがあるが、どのように考えられるか。
- 3) GTS-21 は NF- $\kappa$ B や STAT3 をブロックすることのだが、その上流シグナルであるサイトカインの発現が抑制されるのはなぜか。
- 4)  $\alpha 7$  AChR は中枢神経にも存在しているが、GTS-21 もしくは他の $\alpha 7$  AChR アゴニストの中枢神経への効果を調べた研究はあるのか。

#### 申請者の回答

- 1) 予備実験および先行研究では熱傷 3 日後以降はタンパク分解シグナルの発現はピークアウトする一方で、タンパク合成シグナルの抑制が顕著になった。本研究ではタンパクの分解に焦点を当てているため、熱傷 3 日後の筋重量を測定した。
- 2) MuRF1 と Atrogin-1 はともに炎症メディエーターや FOXO の制御を受けているが、Atrogin-1 は p38 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼなど別のシグナル経路からの制御も受けているとする報告があり、そのようなシグナル経路の違いが影響している可能性がある。また、タンパクレベルでの変化が認められなかった原因として、ウェスタンブロッティングの抗体がワークしていないなど技術的な原因の可能性も考えられる。
- 3) GTS-21 もしくは他の手段による $\alpha 7$  AChR 刺激を用いて抗炎症作用を調べた他の

研究でも、NF- $\kappa$ B だけでなく、サイトカインレベルも低下している結果が認められる。これは、NF- $\kappa$ B が炎症性サイトカインにより活性化されるだけでなく、NF- $\kappa$ B 自身もまた、炎症性サイトカインの発現を促進するためと考える。

- 4)  $\alpha$ 7AChR のアロステリックモジュレーターが認知症を対象とした臨床試験に用いられている。

#### 五嶋良郎副査からの質問

- 1) 本研究での作用点となる  $\alpha$ 7AChR はマクロファージ上にあるのか、骨格筋にあるのか。
- 2) GTS-21 を使用すると熱傷患者のアウトカムが改善するなどのヒトでの優位性は認められているのか。

#### 申請者の回答

- 1) 先行研究によると、不動化による筋萎縮モデルの骨格筋では  $\alpha$ 7AChR がアップレギュレートされており、熱傷による筋萎縮でも同様のレセプター増加が認められる可能性がある。また、萎縮筋は萎縮をもたらす理由にかかわらず炎症細胞の浸潤とそこからのサイトカイン遊離が認められるため、GTS-21 が筋肉に浸潤したマクロファージに作用している可能性もある。本研究における GTS-21 の作用点となる  $\alpha$ 7AChR がどちらにあるかについては、この研究では検討されておらず、今後の課題と考える。
- 2) GTS-21 と LPS を healthy volunteer に投与し、血中のサイトカインを測定した研究がある。その研究では GTS-21 投与によるサイトカイン抑制効果は認められなかった。血中の GTS-21 濃度が予想された濃度の数十分の一と低かったこと、被験者間での血中 GTS-21 濃度のバラツキが大きかったことが原因と考えられる。薬物動態の検討やより有効なコンパウンドの開発が望まれる。

#### 益田宗孝主査からの質問

- 1) 研究仮説において  $\alpha$ 7AChR はマクロファージにあるものを想定しているのか、または筋肉に到達している神経末端を想定しているのか
- 2) サイトカインなどを測定しているが、これは筋細胞内で発現したものを想定しているのか、または細胞質間にあるものを想定しているのか
- 3) 筋萎縮とはどのような状態か。細胞は死滅し、筋線維の数が減少するのか。
- 4) 熱傷 3 日後に体重と骨格筋重量の減少が認められるが、炎症による浮腫などの影響はないのか。
- 5) 熱傷部位の皮膚からの浸出液の漏出などはあるか。
- 6) 炎症反応が筋萎縮の原因ならば、ステロイド投与や他の炎症を抑える薬物などが治療の選択肢となるのではないか。

#### 申請者の回答

- 1) 本研究では  $\alpha$ 7AChR の発現部位における検討がなされておらず、それが limitation の一つとなっている。不動化モデルの萎縮筋で  $\alpha$ 7AChR の発現が

増加していること、萎縮筋は萎縮の原因に関わらず、間質に炎症細胞の浸潤が認められることから、神経筋接合部と間質に浸潤したマクロファージの両方における  $\alpha 7$  AChR が作用点になっていると推察している。どちらが主な作用点であるかは、今後の研究課題である。

- 2) 前の質問と同様に、本研究ではサイトカインが筋細胞から分泌されたものか、間質由来なのかについての検討はなされていない。骨格筋だけでなく、血清サイトカインレベルにも変化が見られたので、筋肉内と間質の両方のサイトカインを見ていると考える。
- 3) 組織学的には筋線維・細胞の数は減らず、一本一本の筋線維の径が細くなっている状態である。タンパク分解により筋線維中の protein content は減少している。
- 4) 体液量や体液分布についての検討はなされなかったが、熱傷後の経過を観察した限りでは、熱傷 1 日後は食餌摂取量の減少にもかかわらず体重がほとんど減少しておらず、体液の貯留がある状態と見ている。一方で、熱傷 2 日後以降に体重の著明な減少が認められ、この時点からは体液貯留傾向はないと考える。前脛骨筋採取時には少なくとも肉眼的な浮腫は認めていない。
- 5) 熱傷部位の皮膚は癒痕化し、滲出液の漏出は認められずドライである
- 6)  $\text{TNF}\alpha$  や IL-6 の特異的阻害薬を用いたヒトでのカヘキシアに対する臨床試験では筋萎縮改善効果は認められなかった。これは、筋萎縮を伴う炎症反応は単一のサイトカインを抑制するだけでは不十分だということを示唆している。また、ステロイドは抗炎症作用を持つが、それ自体が FOXO などの転写因子を活性化させ、筋萎縮を来たすことが知られており、治療薬としては適切ではないと考える。なお、筋肉量を増やす作用を持つタンパク同化ステロイドは糖質コルチコイドなどのストレスホルモンとは構造は異なるものである。

その他いくつかの質問がなされたが、いずれにも適切な回答が得られた。

本研究は熱傷後の炎症反応と筋萎縮の関連を明らかにし、新しい知見として、 $\alpha 7$  アセチルコリン受容体の関与と治療法を示したものであり、博士（医学）の学位に値するものと判定された。